

Kvantitativna analiza fenolnih spojeva ljepljivog omana – *Inula viscosa* (L.) Ait.

ŽELJAN MALEŠ i FRANKO ŠARIĆ

Zavod za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Quantitative analysis of phenolic compounds of false yellowhead - *Inula viscosa* (L.) Ait.

A b s t r a c t – The quantitative analysis of phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids, total polyphenols, nontannic polyphenols and tannins) was carried out in the samples of stems, leaves and flowers of *Inula viscosa*. The content of all investigated compounds was determined using spectrophotometric methods. The quantity of phenolic acids ranged from 1.71 to 5.92%, while the content of flavonoids varied between 0.157 and 0.498%. The leaves contained the highest quantity of phenolic acids. The content of total polyphenols ranged from 4.56 to 11.30%. The quantity of polyphenols unadsorbed on hide powder (nontannic polyphenols) was between 2.65 and 7.37% while the quantity of tannins ranged from 1.91 to 3.93%. Statistical analysis was assessed by Student's *t*-test. The content of all investigated compounds depended on the plant organ and climatic factors.

(Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia)

UVOD

Inula viscosa (L.) Ait. [*Cupularia viscosa* G. et G., *Dittrichia viscosa* Greuter] – ljepljivi oman (bušinac), zeljasta je trajnica iz porodice Asteraceae (1). Biljka je uspravna, visoka 40–140 cm te razgranata, s uočljivim središnjim izdankom. Listovi su sjedeći, izmjenično poredani po stabljici i nazubljenoga ruba usmjerenoga prema vrhu lista. Žute, cvatne glavice imaju 20–22 mm (slika 1). Cijela je biljka, a pogotovo listovi, prekrivena žljezdanim dlakama koje izlučuju ljepljivu smolu aromatičnoga mirisa. Plod je roška s kunadrom i po cvatu ima 40–50 plodova (2).

U okolici Makarske i Zaostruga raste sitnocvati bušinac – *Inula viscosa* f. *nicolina* Radić f. *nova*, koji ima tanju i vitkiju stabljiku te manje cvatne glavice (3). Ljepljivi oman raste samoniklo u području Sredozemlja i na Srednjem istoku (4).

Vrsta *I. viscosa* sadrži biološki aktivne spojeve: flavonoide, seskviterpenske laktone, seskviterpenske kiseline, triterpene itd. (5–7). Fontana i suradnici (8) izolirali su iz acetonskog ekstrakta ljepljivog omana pet seskviterpenskih spojeva, čije su strukture određene spektrometrijskim metodama. Dokazano je da se pri dodiru sa svježim listom ili eterskim ekstraktom iz lista može pojaviti kontaktni alergijski dermatitis, vjerojatno zbog prisutnosti seskviterpenskih laktona (9).

Ljepljivi se oman od davnina primjenjuje u pučkoj medicini kao antipiretik, antiseptik, antidijabetik te kao protuupalno sredstvo (6, 10, 11), a Maoz i Neeman (5) dokazali su njegov antimikotski učinak. Dokazan je i gastroprotektivni učinak flavonoidne frakcije na ozljede izazvane ingestijom određenih iritansa sluznice (12, 13). Značajno je i anthelmintsko djelovanje diklormetanskog ekstrakta iz nadzemnih dijelova biljke (14) te antimikrobni učinak eteričnog ulja na bakterijsku vrstu *Helicobacter pylori* (15).

Ovim se radom željelo odrediti količinu fenolnih spojeva (fenolnih kiselina, flavonoida, ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina) u stabljikama, listovima i cvjetovima ljepljivog omana.

EKSPERIMENTALNI DIO

Materijal za istraživanje

Materijal za istraživanje sastojao se od usitnjenih stabljika, listova i cvjetova ljepljivog omana – *I. viscosa* skupljenih u okolici Zadra u kolovozu 2007. i 2008. godine.

1. Identifikacija biljnog materijala

Istražene biljne vrste identificirane su u Zavodu za farmaceutsku botaniku Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i njihov je identitet potvrđen ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka (1).

2. Određivanje količine fenolnih kiselina

Kvantitativna analiza fenolnih kiselina provedena je spektrofotometrijskom metodom temeljenom na mjerenju apsorbancije kompleksa nastalog u reakciji između fenolnih kiselina i otopine natrijevog nitrita s natrijevim molibdatom (16). Količina fenolnih



Slika . *Inula viscosa* (L.) Ait. – ljepljivi oman (rt Puntamika – Zadar)

kiselina u svim uzorcima određena je tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunane su srednje vrijednosti i standardne devijacije (17, 18).

3. Određivanje količine flavonoida

Kvantitativna analiza flavonoida provedena je spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru (19), koja se temelji na određivanju ukupnih flavonoidnih aglikona nakon stvaranja kompleksa s Al^{3+} u smjesi metanola, etilacetata i octene kiseline. Količina flavonoida u svim uzorcima određena je tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunane su srednje vrijednosti i standardne devijacije (18).

4. Određivanje količine ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak i trjeslovina

Kvantitativna analiza provedena je kombinacijom kolorimetrijske metode i metode kožnog praška (20). Količina ukupnih polifenola u ekstraktu biljnog materijala određena je na temelju plavo obojene reakcije s volfram-fosforom kiselinom. Trjeslovine su uklonjene iz ekstrakta vezivanjem na kožni prašak, a u filtratu su zaostali netaninski polifenoli koji su određeni na isti način kao i ukupni polifenoli. Količina ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak i trjeslovina u svim uzorcima određena je tri puta, a iz dobivenih rezultata izračunane su srednje vrijednosti i standardne devijacije (18, 20).

Za mjerenje apsorbancija pri kvantitativnoj analizi svih navedenih fenolnih spojeva uporabljen je UV/VIS spektrofotometar Varian Cary 50 Bio (proizvod tvrtke Varian Inc., SAD) Zavoda za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Za usporedbu količine fenolnih spojeva između biljnih organa i godina skupljanja primijenjen je Studentov t-test – program SigmaStat(R) 3,5, Copyright (c) 2006 Systat Software, Inc.

REZULTATI I RASPRAVA

1. Kvantitativna analiza fenolnih kiselina

Rezultati kvantitativne analize fenolnih kiselina prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Količina (%)^a fenolnih kiselina u ispitivanim uzorcima

Uzorak	Biljni organ	Datum skupljanja	w (%)
1	stabljika	29.08.2007.	1,71 ± 0,05 ^{b,c,h}
2	list	29.08.2007.	5,30 ± 0,33 ^{b,d}
3	cvijet	29.08.2007.	3,45 ± 0,19 ^{c,d}
4	stabljika	22.08.2008.	3,15 ± 0,03 ^{e,f,h}
5	list	22.08.2008.	5,92 ± 0,07 ^{e,g}
6	cvijet	22.08.2008.	3,32 ± 0,02 ^{f,g}

a = $\bar{x} \pm SD$ (n = 3)

Statistički značajna razlika između biljnih organa sa
signifikantnošću: ^{b,c,e,g,h} $p < 0,001$, ^{d,f} $p < 0,005$.

Istraživani uzorci sadržavali su 1,71–5,92% fenolnih kiselina. Najveću količinu fenolnih kiselina sadržavali su listovi (5,92%, odnosno 5,30%), zatim cvjetovi (3,45%, tj. 3,32%), a najmanju stabljike (3,15% i 1,71%). Uspoređujući količinu fenolnih kiselina ovisno od godine skupljanja, vidljivo je da je sadržaj kiselina u stabljikama i listovima skupljenim 2008. veći u odnosu na 2007. godinu, dok je sadržaj u cvjetovima u obje godine približno jednak. Statističkim testom (Studentov *t*-test) nije nađena značajna razlika u količini fenolnih kiselina u listovima skupljenim 2007. i 2008. godine, kao ni u cvjetovima. Značajne su razlike s visokom signifikantnošću ($p < 0,005$, $p < 0,001$) nađene u količini fenolnih kiselina između biljnih organa skupljenih 2007. godine, kao i u sadržaju kiselina u biljnim organima skupljenim 2008. Stabljike skupljene 2007. i 2008. također imaju znatno različit udio fenolnih kiselina ($p < 0,001$).

2. Kvantitativna analiza flavonoida

Rezultati određivanja količine flavonoida prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Količina (%)^a flavonoida u ispitivanim uzorcima

Uzorak	Biljni organ	Datum skupljanja	w (%)
1	stabljika	29.08.2007.	0,157 ± 0,008 ^{b,c}
2	list	29.08.2007.	0,284 ± 0,001 ^{b,d,h}
3	cvijet	29.08.2007.	0,414 ± 0,002 ^{c,d,i}
4	stabljika	22.08.2008.	0,186 ± 0,001 ^{e,f}
5	list	22.08.2008.	0,498 ± 0,001 ^{e,g,h}
6	cvijet	22.08.2008.	0,316 ± 0,002 ^{f,g,i}

a = $\bar{x} \pm SD$ (n = 3)

Statistički značajna razlika između biljnih organa sa

signifikantnošću: ^b $p < 0,005$, ^{c-i} $p < 0,001$.

Istraživani uzorci sadržavali su 0,157–0,498% flavonoida. Kao i u fenolnih kiselina, najveći sadržaj flavonoida sadržavali su listovi skupljeni 2008. godine (0,498%), dok je u listovima skupljenim 2007. bio znatno niži (0,284%). Cvjetovi skupljeni 2007. bili su bogatiji flavonoidima u odnosu na skupljene 2008. godine (0,414%, odnosno 0,316%). Stabljike su sadržavale najniži, ali sličan sadržaj flavonoida. Kao i u fenolnim kiselinama, veća količina određena je u stabljikama iz 2008. (0,186%) u odnosu na 2007. godinu (0,157%). Međutim, Studentovim *t*-testom pokazalo se da nema značajne razlike u sadržaju flavonoida. Uspoređujući količine flavonoida u pojedinim biljnim organima skupljenim 2007. godine, dobivena je značajna razlika s visokom signifikantnošću ($p < 0,005$, $p < 0,001$). Visoka signifikantnost ($p < 0,001$) dobivena je i uspoređujući količine flavonoida u pojedinim biljnim organima skupljenim 2008. Listovi skupljeni 2007. i 2008. također se znatno razlikuju u sadržaju flavonoida ($p < 0,001$), kao i cvjetovi.

3. Kvantitativna analiza ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak i trjeslovina

Rezultati kvantitativne analize ukupnih polifenola, polifenola neadsorbiranih na kožni prašak (netaninskih polifenola) i trjeslovina prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Količina (%)^a ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina u ispitivanim uzorcima

Uzorak	Biljni organ	Datum skupljanja	Ukupni polifenoli	Netaninski polifenoli	Trjeslovine
1	stabljika	29.08.2007.	4,56 ± 0,04 ^{b,c,g}	2,65 ± 0,15 ^{j,k,o}	1,91 ± 0,11 ^s
2	list	29.08.2007.	8,19 ± 0,53 ^{b,h}	6,07 ± 0,25 ^{j,l,p}	2,12 ± 0,28 ^t
3	cvijet	29.08.2007.	8,65 ± 0,54 ^{c,i}	4,95 ± 0,01 ^{k,l,q}	3,69 ± 0,53
4	stabljika	22.08.2008.	6,60 ± 0,12 ^{d,e,g}	3,85 ± 0,07 ^{m,o}	2,76 ± 0,06 ^{r,s}
5	list	22.08.2008.	11,30 ± 0,05 ^{d,f,h}	7,37 ± 0,11 ^{m,n,p}	3,93 ± 0,05 ^{r,t,u}
6	cvijet	22.08.2008.	5,97 ± 0,02 ^{e,f,i}	3,57 ± 0,11 ^{n,q}	2,40 ± 0,10 ^u

a = $\bar{x} \pm SD$ (n = 3)

Statistički značajna razlika između biljnih organa sa signifikantnošću: ^{b,e,h,i,l,p,t,u} $p < 0,05$, ^{c,o} $p < 0,02$, ^{d,f} $p < 0,001$, ^{g,k,m,n,r} $p < 0,005$, ^{j,q,s} $p < 0,01$.

Istraživani uzorci sadržavali su 4,56 – 11,30% ukupnih polifenola. Najveću količinu ukupnih polifenola sadržavali su listovi skupljeni 2008. godine (11,30%). Sadržaj netaninskih polifenola kretao se od 2,65 do 7,37%, a količina trjeslovina od 1,91 do 3,93%. Listovi skupljeni 2008. sadržavali su najveću količinu netaninskih polifenola i trjeslovina. Studentovim t-testom nije pronađena značajna razlika u količini ukupnih polifenola u listovima i cvjetovima skupljenim 2007. Sadržaj netaninskih polifenola u stabljici i cvjetovima skupljenim 2008. godine također se značajno ne razlikuje. Testom je utvrđeno i da sadržaj trjeslovina u cijeloj biljci skupljenoj 2007. značajno ne varira. Količine trjeslovina između stabljike i cvjetova skupljenih 2008. također se značajno ne razlikuju, kao ni količine istih u cvjetovima skupljenim 2007. i 2008. Znatne razlike nađene su između stabljike i listova te listova i cvjetova skupljenih 2008. u sadržaju ukupnih polifenola ($p < 0,001$) i sadržaju netaninskih polifenola ($p < 0,005$). Nadalje, sadržaji trjeslovina između stabljike i listova skupljenih 2008. također se znatno razlikuju ($p < 0,005$). S visokom signifikantnošću ($p < 0,005$) razlikuju se i sadržaji ukupnih polifenola u stabljikama skupljenim 2007. i 2008. godine, kao i sadržaji netaninskih polifenola u stabljici i cvjetovima skupljenim 2007. godine.

ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju određena je količina fenolnih spojeva (fenolnih kiselina, flavonoida, ukupnih polifenola, netaninskih polifenola i trjeslovina) u stabljikama, listovima i cvjetovima ljepljivog omana - *I. viscosa*. Kvantitativne analize provedene su spektrofotometrijskim postupcima.

Najveću količinu fenolnih kiselina sadržavali su listovi, a najmanju stabljike. Količina flavonoida bila je uvjetovana godinom skupljanja; najveća je bila u listovima, odnosno cvjetovima, a najmanja u stabljikama. Listovi skupljeni 2008. sadržavali su najveću količinu svih fenolnih spojeva. Za statističku analizu primijenjen je Studentov *t*-test.

Količina istraživanih spojeva ovisila je o biljnom organu i klimatskim čimbenicima.

Zahvala. – »Prikazani rezultati proizašli su iz znanstvenog projekta (Farmakobotanička i kemijska karakterizacija cvjetnica hrvatske flore), provođenog uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.»

Literatura – References

1. R. Domac, Flora Hrvatske: Priručnik za određivanje bilja (II izdanje), Školska knjiga, Zagreb 2002, 345.
2. <http://www.maltawildplants.com>, datum pristupa: 25. 11. 2008.
3. J. Radić, Bilje Biokova, Institut »Planina i more« – Malakološki muzej, Makarska 1976, 172.
4. N. M. Al-Dissi, A. S. Salhab, H. A. Al-Hajj, J. Ethnopharmacol. **77** (2001) 117.
5. M. Maoz, I. Neeman, J. Ethnopharmacol. **71** (2000) 479.
6. S. Manez, M. C. Recio, I. Gil, C. Gomez, R. M. Giner, P. G. Waterman, J.-L. Rios, J. Nat. Prod. **62** (1999) 601.
7. M. Grande, P. Torres, F. Piera, I. S. Bellido, Phytochemistry **31** (1992) 1826.
8. G. Fontana, S. La Rocca, S. Passannanti, M. P. Paternostro, Nat Prod Res. **21** (2007) 824.
9. M. Gonçalo, S. Gonçalo, Contact Dermatitis **24** (1991) 40.
10. P. Barbetti, I. Chiappini, G. Fardella, A. Menghini, Planta Med. **51** (1985) 471.
11. Z. Yaniv, A. Dafni, J. Friedman, D. Palevitch, J. Ethnopharmacol. **19** (1987) 145.
12. M. J. Martin, C. Alarcón de la Lastra, E. Marhuenda, F. Delgado, J. Torreblanca, Phytother. Res. **20** (2006) 183.
13. C. Alarcón de la Lastra, A. López, V. Motilva, Planta Med. **59** (1993) 497.
14. C. Susplugas, G. Balansard, J. C. Rossi, J. Julien, M. Gasquet, P. Timon-David, Acta Hort. (ISHS) **96** (1980) 19.
15. D. Silva, E. Denham, L. Faleiro, G. Miguel, C. Cavaleiro, L. Salgueiro, Acta Hort. (ISHS) **680** (2005) 147.
16. European Pharmacopoeia, Fifth Edition (Eur. Ph. 5.0), Vol. 2, Council of Europe, Strasbourg Cedex, 2004, 1990.
17. Ž. Maleš, M. Plazibat, I. Gregov, Farm. glas. **64** (2008) 1.
18. Ž. Maleš, M. Babac, K. Hazler Pilepić, M. Zovko, Farm. glas. **64** (2008) 169.
19. B. Christ, K. H. Müller, Arch. Pharm. **293** (1960) 1033.
20. Ž. Maleš, V. Bilušić Vundać, M. Plazibat, D. Lazić, I. Gregov, Farm. glas. **63** (2007) 155.

Primljeno 27. studenoga 2008.